Tome 60, nº 26. — Décembre 1953

L'action de l'urée sur les compétences cérébrogènes et sensorielles de l'ectoblaste [1]

par

J. GALLERA (Genève)

(Institut d'Anatomie Pathologique — Lausanne, et Institut d'Anatomie — Genève).

Avec 6 figures dans le texte et 2 tableaux.

1. INTRODUCTION

L'ectoblaste n'est susceptible de réagir à l'action de l'inducteur que pendant une période bien déterminée et assez brève de son évolution. Cette réceptivité du feuillet externe, limitée dans le temps, a été dénommée, par Waddington (1938) la « compétence ».

Il est important de connaître les modifications progressives de la réactivité de l'ectoblaste, indépendamment de toutes les influences exercées sur lui par son ambiance embryonnaire. A mon avis la seule méthode qui permette d'étudier directement ce problème est celle employée par Holtfreter dans ses investigations de 1938. Il a prélevé des fragments d'ectoblaste ventral de jeunes gastrulas de Triton, puis les a cultivés pendant une période plus ou moins longue en solution saline. Ensuite il a greffé ces fragments sur la voûte archentérique d'autres embryons. Cependant, les greffons de Holtfreter étaient petits, adhéraient imparfaitement au substratum et étaient placés à côté du foyer central de l'inducteur,

[1] Ce travail a bénéficié d'un subside du Fonds national suisse de la Recherche scientifique.

plus ou moins latéralement par rapport au névraxe des embryons-hôtes. Dans ces conditions les implantats ne sont pas en état de réaliser toutes leurs possibilités évolutives et, par conséquent, les résultats de HOLTFRETER ne sont qu'approximatifs.

Vu l'importance de l'évolution intrinsèque, et dans une large mesure autonome, de l'ectoblaste dans la morphogénèse — importance qui se révèle plus grande qu'on ne l'avait pensé il y a quelques années — j'ai repris l'étude de ce problème dans une publication récente (1952).

Dans ce travail j'avais mis au point un procédé expérimental qui d'une part dégrade le moins possible les possibilités évolutives des explantats ectoblastiques et, d'autre part, les soumet à une action inductrice puissante et permettant la réalisation de structures variées et hautement organisées. Guidé par les résultats d'expériences préliminaires, j'avais adopté la méthode suivante: Les explantats avaient été prélevés sur de jeunes gastrulas, parvenues exactement au stade d'apparition de l'encoche blastoporale. Les germes avaient été coupés un peu obliquement par rapport au plan frontal et les cupules ventrales avaient été unies deux par deux de telle sorte que, leurs bords s'étant soudés presque instantanément, elles formaient des ballons exclusivement ectoblastiques. Ce procédé, introduit pour éviter des altérations dans la structure de la face interne de l'ectoblaste, s'était révélé efficace. A partir des explantats, cultivés pendant un laps de temps plus ou moins long dans la solution saline de HOLTFRETER, de grands greffons avaient été excisés et implantés sur la tête de jeunes neurulas dont l'ectoblaste céphalique avait été enlevé préalablement. Pour des raisons d'ordre pratique, j'avais utilisé comme hôtes des germes au début de la neurulation, car l'opération et la localisation de greffes sont particulièrement faciles à ce stade évolutif. Mes greffons, grâce à leur grande dimension et à cause de leur emplacement, avaient la possibilité de donner du cerveau et les organes des sens correspondant. Si j'ai choisi des inductions céphaliques c'est qu'elles présentent un objet particulièrement favorable pour l'étude des possibilités évolutives inhérentes au feuillet externe. En fait, les structures neurales observées par HOLTFRETER (1945, 1947) dans ses explantats ectoblastiques exposés à l'action de solution saline à tendances cytolytiques révélaient toujours un caractère nettement prosencéphalique, pourvu que leur différenciation fût suffisante. Ces

expériences et plus tard d'autres encore, surtout celles de YAMADA (1950), avaient déjà laissé prévoir que la différenciation acrencéphalique (DALCQ) représente une réaction primaire et dans un sens la plus simple de l'ectoblaste stimulé. Cette idée a été confirmée, semble-t-il définitivement, par les investigations récentes de NIEUWKOOP (1952).

Les résultats de mes recherches décrites plus haut peuvent se résumer comme suit: la diminution des compétences de l'ectoblaste isolé et cultivé *in vitro* est très lente pendant le laps de temps qui correspond à la gastrulation chez les embryons normaux, embryons-témoins. De plus, cette diminution des compétences est d'ordre plus quantitatif que qualitatif et se traduit selon l'âge du greffon par une certaine réduction des dimensions du cerveau et des organes des sens qui y sont induits. Cependant, cette réduction n'est pas égale pour toutes les parties du cerveau, elle frappe particulièrement sa région infundibulaire et la voûte diencéphalique. L'ectoblaste cultivé *in vitro* au-delà de la gastrulation subit une véritable crise évolutive, exactement à l'âge où l'on voit apparaître l'ébauche neurale sur l'embryon normal. A ce moment les greffons perdent brusquement leurs compétences ophtalmogènes et presque simultanément les neurogènes. La capacité de bâtir l'organe olfactif persiste un peu plus longtemps, mais elle s'éteint à son tour et bientôt l'ectoblaste mis en contact avec l'inducteur ne peut fournir que des organes apparaissant plus tardivement dans le développement normal, soit les balanciers et le stomodaeum.

L'analyse de ces résultats m'a suggéré l'idée que la déperdition progressive de la réactivité de l'ectoblaste vieillissant est dans une certaine mesure conditionnée par la diminution progressive de la perméabilité des cellules ectoblastiques. En fait, les substances morphogénétiquement actives, soit provenant de l'inducteur soit synthétisées sous leur influence au sein de l'ectoblaste, s'y répartissent en champ-gradient dont les dimensions et l'organisation dépendent en premier lieu des propriétés intrinsèques de cet ectoblaste lui-même (NIEUWKOOP, 1952). La diffusion de ces substances étant limitée dans mes greffons âgés, leur concentration s'abaisserait brusquement dans le liseré de l'ectoblaste s'étalant en dehors du territoire préchordal le plus riche en substances inductrices. Par conséquent la plaque cérébrale induite correspondrait tout entière à la région antéro-médiane de la plaque cérébrale normale,

ce qui rendrait parfaitement compte du caractère mal proportionné et déficient des ébauches encéphaliques constituées par mes implantats âgés.

Un essai de vérification expérimentale de cette hypothèse de la modification progressive de la perméabilité de l'ectoblaste — tel est le sujet du travail présent.

Je ne vois qu'un seul moyen d'éprouver le bien-fondé de cette hypothèse: augmenter, dans une série d'expériences, la perméabilité cellulaire de greffons ectoblastiques, et la diminuer dans une autre. Réaliser ce projet d'expériences comporte une difficulté majeure, celle de trouver des substances chimiques capables de modifier d'une façon plus ou moins durable la perméabilité cellulaire sans altérer sensiblement d'autres propriétés des greffons. Il y a cependant une action perméabilisante de l'urée sur la couche corticale de la cellule qui est connu de longue date. Récemment encore Fautrez (1951) a démontré que l'exposition d'embryons de grenouille rousse à l'action d'une solution d'urée amène une diffusion remarquable de substances organospécifiques, ordinairement très peu diffusibles. Il est particulièrement frappant que la diffusion de ces substances depuis la chorde vers les organes voisins entraîne au sein de ceux-ci la constitution de petits groupes de cellules chordalisées. De plus ces anomalies caractéristiques du développement se sont manifestées chez des embryons qui avaient été transportés de la solution d'urée dans l'eau ordinaire plusieurs heures avant l'apparition de l'ébauche chordale. Ceci prouve que les modifications provoquées par l'urée dans la structure interne de cellules embryonnaires sont relativement durables. Par conséquent, l'emploi de l'urée comme agent perméabilisant l'ectoblaste dans mes investigations s'est imposé tout naturellement et, en fait, l'expérimentation a pleinement confirmé mes prévisions.

Mon choix d'un facteur diminuant la perméabilité de l'ectoblaste s'est révélé moins heureux. C'est une notion classique de cytophysiologie qu'un excès d'ions calcium agit sur la couche superficielle de la cellule en diminuant sa perméabilité. Dans notre seconde série d'expériences j'ai exposé les embryons à l'action d'une solution de la même composition qualitative que celle de Holtfreter mais fortement enrichie en chlorure de calcium. Il va de soi que les embryons-porteurs des greffons ont été élevés dans une solution de Holtfreter non modifiée, car si ce n'était le cas il y

aurait eu des modifications parallèles de l'ectoblaste et de l'inducteur. Les prestations des greffons traités préalablement par une solution enrichie en calcium paraissent être moindres que celles des greffons de contrôle, mais la différence est trop faible pour qu'on puisse en tirer des conclusions sûres. Ce résultat incertain et sur lequel nous ne reviendrons pas est, pourtant, facile à expliquer: les effets de l'excès d'ions calcium sur la structure du cortex sont peu durables et s'effacent complètement après le transfert des embryons dans une solution physiologique normale.

* * *

En terminant cette introduction, je me fais un agréable devoir d'exprimer ma reconnaissance à MM. les professeurs J.-L. Nicod et J.-A. Baumann pour l'hospitalité qu'ils m'ont libéralement accordé dans leurs laboratoires et pour les excellents moyens de travail qu'ils ont mis à ma disposition. Ma gratitude s'adresse aussi à la Commission du Fonds national suisse, et en particulier à M. le professeur R. Matthey, pour l'obtention de la subvention qui a rendu possible l'exécution de ce travail.

2. MATÉRIEL ET TECHNIQUE

De même que dans mes investigations relatées plus haut, toutes les expériences, dont nous allons nous occuper maintenant, ont été faites sur un Urodèle *(Triturus alpestris)*. Cependant, la technique opératoire employée dans mes recherches antérieures s'est révélée inapplicable aux essais de culture d'explantats en solution d'urée. Dans une telle solution les bords des cupules ectoblastiques ne se soudent pas, les explantats se ratatinent et se plient irrégulièrement, de nombreuses cellules se détachent de l'ectoblaste et se dispersent sur le fond du récipient. J'ai été donc forcé de recourir à un procédé moins parfait du point de vue théorique, mais le seul correspondant aux conditions expérimentales imposées par le but poursuivi dans cette étude. Ce ne sont pas des explantats ectoblastiques qui ont été cultivés dans une solution contenant de l'urée, mais des embryons entiers. Ce milieu de culture a été composé de solution de Holtfreter et d'une solution d'urée à 1%,

de telle sorte que leur mélange contenait cette dernière à raison de 0,75% [1]. Ce mélange était légèrement acide, son pH étant de 6,35.

Les embryons-donneurs sont colorés *in toto* au bleu de Nil et plongés dans notre solution juste au moment de l'apparition de l'encoche blastoporale. Pour faciliter la pénétration de l'urée, la lèvre dorsale du blastopore est excisée et le blastocèle lavé à l'aide d'une fine pipette. Les expériences d'excision de la jeune lèvre blastoporale, récemment reprises méthodiquement par Schenk (1951), sont suffisamment nombreuses pour qu'on connaisse les effets de cette intervention chirurgicale: une partie des embryons opérés révèlent une régulation complète, les autres sont atteints de microcéphalie plus ou moins grave. Evidemment, dans mes expériences, l'action de l'urée s'ajoute encore à ces effets. En fait, la gastrulation de nos embryons est plus ou moins retardée et une partie d'entre eux sont atteints d'exogastrulation partielle, généralement légère.

Les germes sont cultivés dans notre solution jusqu'au moment de l'apparition du sillon médian chez les embryons-témoins. (Etant donné l'irrégularité du développement de nos embryons-donneurs, leur âge n'a pu être apprécié que selon l'état évolutif moyen atteint par les embryons-témoins, toujours nombreux.) A ce moment les embryons sont opérés. Chaque opération nécessite trois embryons: un hôte (très jeune neurula), un donneur principal (embryon traité par l'urée), un donneur supplémentaire (neurula âgée colorée au rouge neutre). Ces trois embryons sont transportés dans un cristallisoir dont le fond est couvert d'une couche d'agar et qui contient de la solution de Holtfreter additionnée d'un sulfamidé (Elkosine Ciba) dans la proportion de 2 pour mille [2]. Tout l'ectoblaste céphalique de l'embryon-hôte est excisé et à sa place sont implantés deux greffons: en avant et jusqu'au niveau de l'extrémité antérieure de la chorde — le greffon principal prélevé

---

[1] Quelques essais de culture de nos embryons en solution d'urée pure à 1% semblent montrer que l'urée à cette concentration diminue déjà sensiblement les possibilités évolutives des greffons qui, transplantés sur la voûte archentérique de jeunes neurulas, perdent toute possibilité de différenciation.

[2] Cette solution est nettement alcaline, son pH étant de 8,9. Cependant ce milieu alcalin n'altère nullement le développement embryonnaire, comme l'a prouvé la pratique de ces quelques dernières années, l'emploi d'Elkosine étant devenu courant en technique embryologique.

de la face ventrale de l'embryon traité par l'urée, plus postérieurement — le greffon supplémentaire — une large bande d'épiblaste ventral de la neurula âgée et colorée en rouge. Cette dernière intervention est réalisée dans le but de séparer le greffon principal et le névraxe de l'hôte par une large zone épiblastique. En fait, l'épiblaste d'une neurula âgée n'est plus capable de changer la direction de sa différenciation.

Pour faciliter l'adhésion des greffons à leur substratum, adhésion toujours difficile quand il s'agit de l'ectoblaste traité préalablement par l'urée, l'embryon opéré est couvert, pendant une demi-heure environ, d'une mince lame de mica. Ensuite, les opérés (porteurs des greffons) sont transportés dans de nouveaux cristallisoirs contenant une solution fraîche de Holtfreter additionnée d'Elkosine. Ils y sont élevés de 9 à 14 jours.

Dans une autre série d'expériences où il s'agit de matériel de comparaison et de contrôle, le greffon principal est prélevé à partir d'embryons normaux, non traités par l'urée. Ces greffons sont excisés à partir d'embryons ayant atteint l'un des trois stades évolutifs suivants: jeune gastrula dont le blastopore est en fer à cheval, gastrula munie de blastopore circulaire, très jeune neurula au stade du sillon médian [1].

Les embryons sont fixés au Zenker acétique. La coloration vitale au bleu de Nil est maintenue dans le matériel fixé grâce au bain de 2 heures dans une solution d'acide phosphoromolybdénique à 1% et par le passage dans les alcools additionnés du même acide. Les coupes sont posées alternativement sur deux lames porte-objets. Les unes sont déparaffinées et montées directement dans le cedax, les autres sont colorées à l'hémalun et le mélange d'éosine et d'orange.

3. RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Il est logique de commencer l'examen de nos expériences par l'analyse des résultats des greffes de l'épiblaste présomptif normal. De plus, c'est une occasion de comparer les résultats des expé-

[1] Il va de soi que le choix du stade évolutif des donneurs employés dans notre première série d'expériences a été dicté par l'analyse des résultats de ces expériences de contrôle.

riences, où nous avons prélevé des greffons à partir d'embryons entiers, avec ceux des expériences d'implantations de fragments de l'ectoblaste cultivé *in vitro*.

Depuis longtemps déjà on a remarqué une certaine différence dans le développement de ces deux genres de greffons (greffons prélevés d'embryons et greffons excisés de l'ectoblaste cultivé *in vitro*). En effet, les modifications de la réactivité de l'ectoblaste vieillissant ont été étudiées par de nombreux auteurs et à l'aide de techniques variées. Rappelons seulement les translocations de territoires ectoblastiques effectuées par Lehmann (1929), les greffes de la lèvre blastoporale sous l'épiblaste ventral des embryons de plus en plus âgés (Machemer, 1932) et, enfin, les recherches déjà mentionnées de Holtfreter (1938) qui a examiné le développement des greffons provenant de l'ectoblaste cultivé plus ou moins longtemps *in vitro*. Cependant, la comparaison des résultats obtenus par les auteurs cités, vu les différences de techniques employées, ne peut être poussée très loin. Néanmoins, ces résultats suggéraient qu'un fragment quelconque de l'ectoblaste cultivé hors de l'organisme, en solution saline, garderait plus longtemps ses compétences neurogènes que le même matériel laissé en place, dans son ambiance embryonnaire normale. Ce phénomène s'expliquerait aisément. L'ectoblaste isolé de tout contact avec le chordomésoblaste ne produit qu'un amas cellulaire indifférent; toutes les différenciations du feuillet externe, qu'elles soient nerveuses, ganglionnaires, pigmentaires ou épidermiques, sont le résultat de l'action inductrice exercée par le matériel chordomésoblastique sous-jacent. Par conséquent, la direction du développement de l'ectoblaste ventral est déjà plus ou moins orientée au cours de la gastrulation par l'action exercée sur lui par le mésoblaste latéro-ventral. Or, toute orientation implique déjà une certaine limitation. Le grand mérite des investigations de Lehmann a été de démontrer qu'un greffon ectoblastique (même s'il est prélevé à partir d'un embryon très jeune — d'une gastrula au blastopore circulaire, par exemple), placé dans une nouvelle position, ne rallie que fort progressivement son nouveau mode de développement. C'est particulièrement frappant quand il s'agit de la cytodifférenciation. Autrement dit, l'organe neural formé aux dépens de l'épiblaste présomptif s'ébauche d'une façon atypique et n'acquiert son organisation normale que petit à petit.

Dans mes expériences, contrairement aux travaux cités plus haut, la technique opératoire de même que la localisation des greffons et leurs dimensions ont été toujours identiques.

Les résultats de mes expériences plus anciennes (greffes de l'ectoblaste cultivé *in vitro*) et des actuelles (greffons prélevés d'embryons entiers) sont rapportés globalement sur le tableau 1.

Si l'on compare les résultats des implantations de ces deux sortes des greffons on constate d'une part une analogie parfaite, en ce qui concerne le caractère et l'allure générale de l'épuisement progressif de compétences de l'ectoblaste greffé, et, d'autre part, une différence nette dans le moment de la manifestation de ce phénomène. Dans les deux cas, l'affaiblissement de la réactivité de l'ectoblaste greffé se manifeste par la réduction des dimensions du cerveau, cette réduction frappe tout d'abord et en premier lieu la région infundibulaire et la voûte diencéphalique, d'où suppression précoce de la constitution de l'infundibulum et la non-formation fréquente de l'épiphyse. Ensuite, on constate une simplification générale de la structure du cerveau dont la subdivision en vésicules cérébrales secondaires devient de moins en moins accentuée. Enfin, les greffons plus âgés ne peuvent constituer que des amas neuraux de caractère indéfini. Un cas typique de ce genre est illustré par nos figures 1 et 2. Ce sont, faits à l'aide de la chambre claire, des dessins de deux coupes transversales de la larve 229. Le greffon, comme le prouve la présence de grains de bleu de Nil sur les coupes-témoins, a constitué l'épiblaste épaissi de la tête, deux balanciers et un cordon neural plein (voir fig. 1). Un peu plus vers l'arrière on trouve un amas

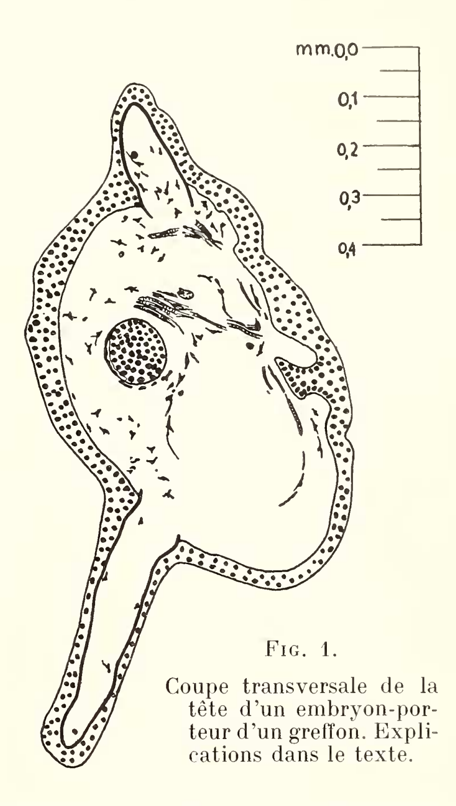


Fig. 1.

Coupe transversale de la tête d'un embryon-porteur d'un greffon. Explications dans le texte.

TABLEAU 1.

	Expériences de 1952 (Greffes de l'ectoblaste cultivé *in vitro*)			Expériences actuelles (Greffons prélevés d'embryons entiers)		
	Stades d'embryons-témoins au moment de l'implantation du greffon)			Stade du donneur au moment du prélèvement du greffon		
	Petit blastopore circulaire	Sillon médian	Liseré pigmenté	Blastopore en fer à cheval	Blastopore circulaire	Sillon médian
Nombre d'embryons opérés:	12	21	8	28	16	20
Structures fournies par les greffons						
Structures neurales	12 (100%)	16 (76,1%)	4 (50%)	28 (100%)	11 (68,7%)	1 (5%)
Prosencéphale	12 (100%)	11 (52,3%)	1 (12,5%)	28 (100%)	9 (56,2%)	
Paraphyse	12 (100%)	10 (47,6%)	1 (12,5%)	27 (96,4%)	7 (43,7%)	
Epiphyse	5 (41,6%)	3 (14,2%)		16 (57,1%)	4 (25%)	
Infundibulum	2 (16,6%)			5 (17,8%)		
Mésencéphale	12 (100%)	8 (38%)	1 (12,5%)	27 (96,4%)	9 (56,2%)	
Organe olfactif	12 (100%)	17 (80,9%)	3 (37,5%)	28 (100%)	10 (62,5%)	
Organe visuel	12 (100%)	11 (52,3%)		28 (100%)	9 (56,2%)	

composé de neuroblastes au centre et d'un manteau névroglique, amas que nous voyons à un plus grand grossissement sur la figure 2. Il est creusé d'une petite cavité excentrique et de sa face ventrale émergent deux excroissances (ébauches de nerfs ?) dont la gauche contient de nombreux lemnoblastes. (La petite sphérule fortement pigmentée qu'on voit en haut de notre dessin représente un nodule épithélial.)

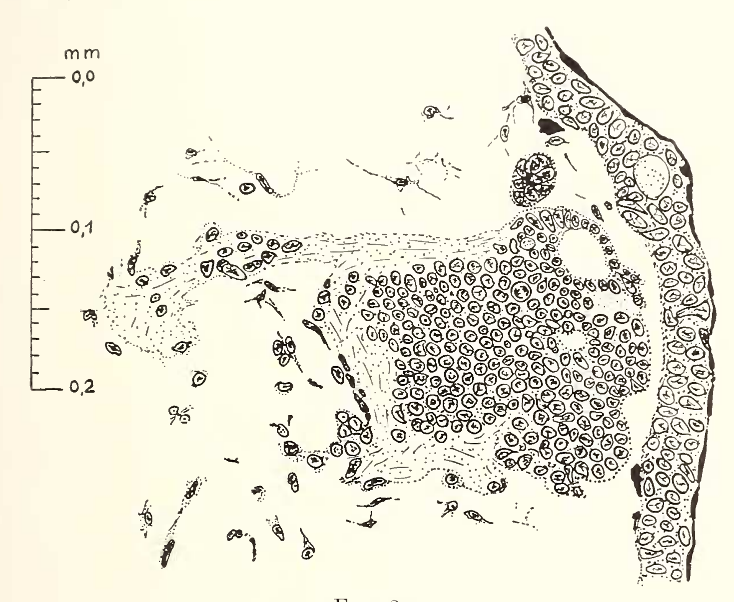


Fig. 2.
Même embryon que sur la figure 1.
Coupe plus postérieure.

Quant aux organes des sens, les ébauches oculaires sont les premières touchées. Grâce à la réduction progressive de la région infundibulaire du cerveau, les yeux communiquent largement entre eux et avec la cavité cérébrale. Dans les greffons plus âgés ils ne se forment même plus. La capacité de bâtir un organe olfactif persiste au moins aussi longtemps que celle de fournir des structures neurales.

Bien que la nature de la diminution de la réactivité de l'ectoblaste vieillissant soit la même dans nos deux catégories d'expériences, elle se manifeste remarquablement plus tôt dans les greffons prélevés d'embryons entiers que dans les greffons excisés d'ectoblaste cultivé *in vitro*. Pour ces derniers, l'affaiblissement des com-

pétences cérébrogènes et sensorielles est à peine perceptible dans les greffons implantés au moment où les embryons-témoins ont atteint le stade de la gastrula munie d'un blastopore circulaire, tandis que 30% environ des greffons prélevés des embryons du même âge ne peuvent plus bâtir ni un organe neural ni des ébauches oculaires et olfactives. De 20 implantats prélevés d'embryons au début de la neurulation (stade du sillon médian) un seul (larve 229) a pu constituer un rudiment neural; en revanche la plupart des greffons excisés de l'ectoblaste cultivé *in vitro* et ayant atteint cet âge ont encore fourni des structures cérébrales hautement organisées et accompagnées d'organes des sens correspondants.

Greffes de l'épiblaste ventral des embryons traités par l'urée.

Tous les implantats sont excisés de la face ventrale des donneurs un peu en arrière de l'ébauche hépatique future. L'opération est faite exactement au moment où chez les témoins débute la neurulation (blastopore en pertuis ou linéaire, sillon médian bien prononcé, liseré pigmenté pas encore formé, plaque neurale pas visible extérieurement). Comme l'ont démontré les expériences décrites plus haut, chez l'embryon normal à ce stade évolutif, l'épiblaste ventral a déjà perdu définitivement ses compétences sensorielles et cérébrogènes. Afin de répondre à l'objection éventuelle que l'état évolutif de nos embryons traités par l'urée ne peut être comparé à celui des embryons normaux du même âge (à cause d'un certain retard de la gastrulation et de l'excision précoce de la lèvre blastoporale), insistons dès à présent sur le fait que l'excision de la lèvre blastoporale porte exclusivement sur le matériel chordomésoblastique dorsal. Donc l'épiblaste prélevé est déjà dans l'embryon doublé de mésoblaste ventral. D'ailleurs, cet ectoblaste est sensiblement plus mince que celui d'une gastrula et de plus l'extensibilité de nos greffons prouve que cet ectoblaste est déjà modifié dans sa structure interne sous l'influence du mésoblaste ventral, ce qui est le seul facteur vraiment important pour l'interprétation exacte des résultats obtenus.

Les résultats individuels de 23 transplantations de ce type sont groupés dans le tableau 2 [1].

[1] Les embryons, après avoir été examinés microscopiquement, ont été numérotés à nouveau pour simplifier l'exposé.

Tableau 2[1].

Structures fournies par le greffon	Numéro																						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
Prosencéphale	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
Paraphyse	×	×	×	×	×	×	×	×			×		×	×	×	×	?						
Epiphyse	×		×	?			×																
Infundibulum	×	×																					
Mésencéphale	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+				+		+	+				
Placodes olfactives	2	2	1	2	3	3	2	2	2	2	1	4	2	2	1	2	2	2	3	1			
fusionnées												×						×					
Structures optiques	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+					
Yeux séparés	×	×					1				1	3	1		1		1						
Ebauche commune			×	×	×	×		×	×	×				×				×					
Cristallins	2		3	2	2		1	6	2	1				2			1	2					

[1] + = présence de l'ébauche. × = différenciation de l'ébauche.

Ce tableau exige quelques commentaires et tout d'abord en ce qui concerne les yeux. Sous la rubrique « Ebauche commune » j'ai groupé aussi bien les cas où les cupules optiques communiquent directement entre elles que ceux où il ne s'est constitué qu'une seule ébauche mais qui révèle par sa position et structure une nette symétrie bilatérale. Les structures neurales fournies par nos greffons 17 et 20 sont extrêmement simplifiées — le premier greffon n'a formé qu'une petite vésicule, le second n'a donné qu'un simple nodule neural. Cependant, la présence des placodes olfactives dans les deux cas et d'une ébauche oculaire, si imparfaite soit-elle, chez l'embryon 17 permet de reconnaître dans ces structures neurales les rudiments du prosencéphale normal. Il reste à mentionner que les structures énumérées dans le tableau n'englobent pas toutes les prestations de nos greffons. Ceux-ci ont encore donné de l'épiblaste céphalique, des balanciers dont le nombre dépasse fréquemment la norme, et du stomodaeum. Dans quelques cas où les greffons s'étalent plus loin vers l'arrière qu'on ne l'a voulu, ils fournissent du rhombencéphale et des otocystes. Ce qui frappe, enfin, dans notre tableau, c'est la grande variabilité des résultats individuels: quelques-uns des greffons ont constitué du cerveau et des organes des sens hautement évolués, en revanche dans trois cas (21, 22, 23) les implantats n'ont fourni que de l'épiblaste céphalique et des balanciers. Cette variabilité des résultats s'explique surtout par le fait que l'âge des donneurs n'a pu être apprécié qu'approximativement, selon le stade évolutif atteint par les embryons-témoins. Il va de soi que les écarts d'âge de nos greffons doivent être plus ou moins symétriques, autrement dit: certains de ces greffons ont été plus jeunes et d'autres plus âgés qu'on ne l'a voulu. Il nous faut donc considérer comme résultat de base la formation du cerveau de dimensions réduites et de structure simplifiée, sans individualisation des vésicules cérébrales secondaires, et ne comprenant ni infundibulum ni épiphyse. En revanche les placodes olfactives et les yeux sont induits, mais les compétences ophtalmogènes de l'ectoblaste étant déjà diminuées, les cupules optiques sont le plus souvent fusionnées.

Avant d'aborder l'analyse détaillée des structures neurales et sensorielles réalisées dans nos greffons, comparons le résultat global de ces expériences avec celui des transplantations d'ectoblaste du même âge mais excisé d'embryons élevés dans des condi-

tions normales. A cet âge, comme on s'en souvient, les possibilités organoformatrices de l'ectoblaste ventral normal sont déjà presque complètement épuisées. Nos greffons, à l'exception d'un seul (20 expériences) qui a constitué deux nodules neuraux de caractère indéfini, n'ont fourni que de l'épiblaste banal et des balanciers. Au contraire, lorsque nous transplantons de l'ectoblaste traité par l'urée un tel résultat n'est qu'une prestation minimale de cet ectoblaste traité, prestation réalisée dans trois cas seulement. Les vingt autres greffons ont tous fourni au moins un rudiment neural, quelquefois un cerveau hautement organisé, et des placodes olfactives. La plupart de nos greffons ont encore bâti un organe visuel plus ou moins complètement développé. Entre le mode de réaction de l'ectoblaste normal et celui de l'ectoblaste traité par l'urée il y a donc une différence extrêmement nette, dépassant les marges d'erreur possible. Il faut en conclure qu'effectivement l'action de l'urée retarde considérablement la déperdition progressive et inévitable des compétences neurogènes et sensorielles de l'ectoblaste vieillissant.

L'examen microscopique de nos embryons a encore révélé que l'organisation des structures induites dans nos greffons traités par l'urée est tout à fait comparable à celle des structures correspondantes réalisées dans les greffons prélevés soit d'ectoblaste cultivé *in vitro* soit d'embryons entiers. La seule différence réside en ce que les ébauches oculaires constituées par les greffons traités à l'urée sont fréquemment trop volumineuses par rapport au cerveau qui lui, au contraire, est de taille fort réduite. Ceci semble indiquer que dans ces greffons les compétences ophtalmogènes ont été particulièrement bien maintenues. Notons encore que dans un cas (embryon 8) nous avons observé l'apparition inattendue de 6 cristallins. Bien qu'unique cette observation nous paraît significative. En fait, il s'agit ici d'une réaction excessive de l'épiblaste issu de notre greffon à l'action inductrice secondaire provenant de l'ébauche optique.

Le lecteur trouvera dans ma publication antérieure l'analyse détaillée des particularités de l'organisation des structures induites dans l'ectoblaste vieillissant et la discussion de la signification théorique de ces particularités. Dans ce travail ne seront décrits que deux cas: l'expérience 3, où nous avons obtenu la formation de cerveau et d'organes des sens particulièrement évolués, et

l'expérience 8, où le greffon a constitué les six cristallins déjà mentionnés.

La figure 3 montre la reconstruction graphique des structures induites dans le greffon 3, les contours de ces structures étant projetés sur le plan frontal. La figure 4 reproduit la coupe transversale de la tête de notre larve (le niveau de la section étant indiqué par deux flèches sur notre reconstruction).

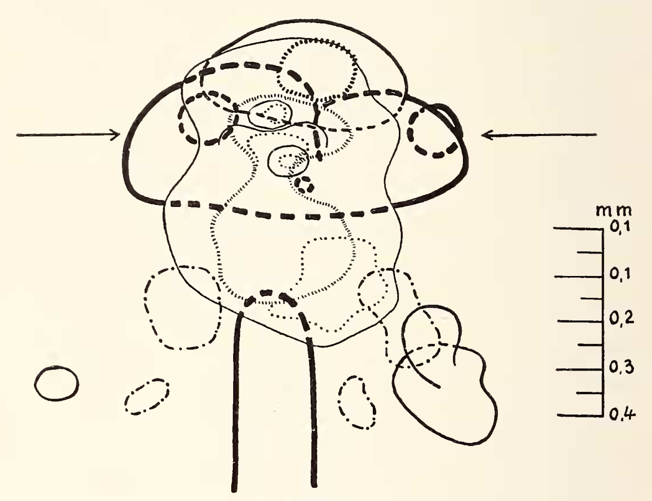


Fig. 3.

Reconstruction graphique des structures induites dans le greffon 3. Les contours de ces structures sont projetés sur le plan frontal. Le complexe cérébro-sensoriel est représenté du côté dorsal, les structures vues par transparence — en traits interrompus. Les contours du cerveau — en traits minces, ceux de la placode olfactive et des otocystes — en traits d'épaisseur moyenne. L'ébauche oculaire et la chorde de l'hôte sont représentées par des gros traits, les masses ganglionnaires — par les traits interrompus-pointillés. Les contours des cavités dans les ébauches sont hachurés ou pointillés.

Le greffon, s'étalant plus vers l'arrière que d'ordinaire, a constitué en plus du prosencéphale une bonne partie du rhombencéphale et les deux otocystes, d'ailleurs de taille fort réduite. Le télencéphale rudimentaire est représenté par une très petite vésicule qui communique en avant et en arrière avec le « troisième ventricule ». Les deux ventricules latéraux ne se sont pas individualisés. La paraphyse et l'épiphyse sont bien constituées. « Le quatrième ventricule » est de forme à peu près normale, cependant sa voûte est excessivement épaisse et creusée d'une étroite fente (en pointillé

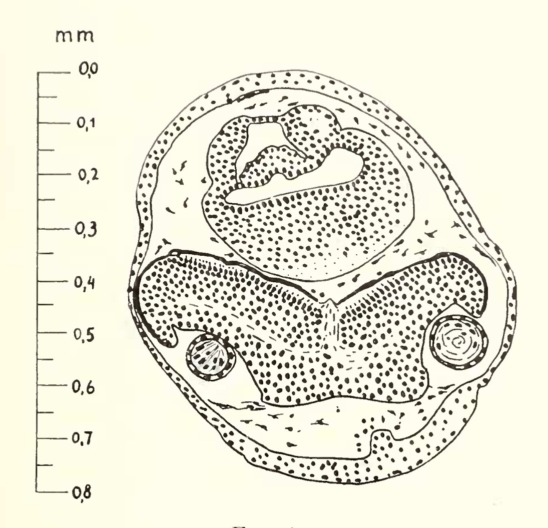


Fig. 4.

Coupe transversale de la tête de la larve 3 pratiquée au niveau indiqué par deux flèches sur la figure précédente.

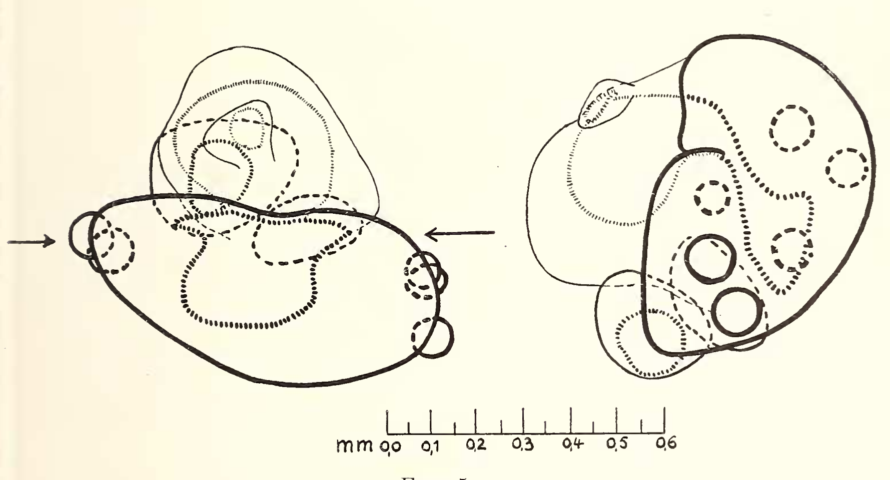


Fig. 5.

Reconstruction graphique des structures induites dans le greffon 8. A gauche — une projection sur le plan frontal, à droite — sur le plan sagital. Diverses structures sont représentées par les mêmes traits que sur la figure 3.

sur la reconstruction). Il ne s'est formé qu'une seule, mais grande et typique, placode olfactive. Les yeux sont bien développés, cependant les deux rétines sont fusionnées ventralement et reliées au cerveau par un seul pédicule optique. Les cristallins situés dans le creux de deux cupules optiques (voir fig. 4) sont bien organisés; plus caudalement et sous la ligne de fusion des deux rétines se trouve encore un petit nodule d'aspect cristallinien (cristalloïde).

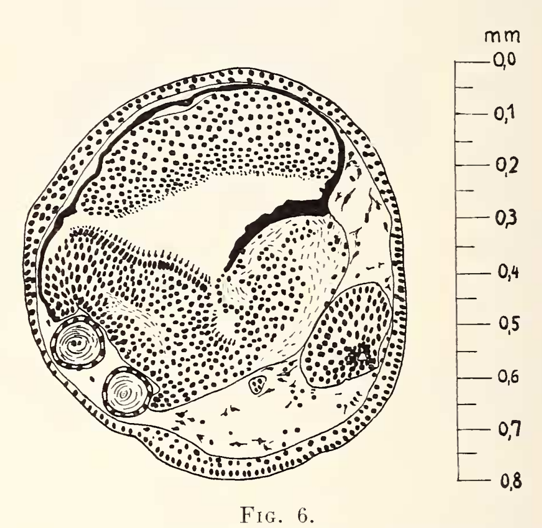


Fig. 6.

Coupe transversale de la tête de la larve 8 pratiquée au niveau indiqué par deux flèches sur la reconstruction.

Il est à remarquer que les dimensions de l'organe visuel sont nettement trop grandes par rapport au prosencéphale (l'étranglement de la cavité centrale du cerveau correspond au mésencéphale).

Les structures induites dans le greffon 8 sont illustrées sur nos figures 5 et 6. La première représente deux reconstructions graphiques (à gauche, les structures reproduites sont projetées sur le plan frontal, à droite sur le plan sagittal). La seconde reproduit une coupe transversale, pratiquée au niveau indiqué par deux flèches sur la reconstruction.

Le cerveau est limité au prosencéphale de taille réduite et de structure simplifiée. Il affecte la forme d'une simple vésicule munie de la paraphyse typique. La paroi de cette vésibule cérébrale se continue directement dans le feuillet visuel de la rétine d'une énorme ébauche oculaire. La cavité centrale de cette ébauche ne

représente qu'un diverticule de la cavité cérébrale. Sur la figure 6 nous voyons à droite et en bas la partie postérieure de la paroi cérébrale. En haut elle est couverte par le feuillet pigmenté de la rétine et à gauche elle se continue dans le feuillet visuel. La rétine ébauche de deux côtés de la tête de la larve deux cupules optiques rudimentaires. Sur la figure 6 nous voyons celle de gauche, elle contient deux cristallins typiques. La position de quatre autres cristallins est indiquée sur la reconstruction. Les deux placodes olfactives sont très inégalement développées; la gauche, située plus en avant, est grande et creusée d'une fossette typique, la droite, plus postérieure, est rudimentaire.

4. CONCLUSIONS

1. Si l'on considère d'une part les structures induites dans des greffons ectoblastiques prélevés d'embryons entiers de plus en plus âgés et d'autre part les structures réalisées dans des greffons excisés de l'ectoblaste cultivé *in vitro*, en solution de Holtfreter, il apparaît que les compétences neurogènes et sensorielles disparaissent plus rapidement dans l'ectoblaste laissé en place, sur l'embryon entier, que dans l'ectoblaste soustrait dès le début de la gastrulation aux influences provenant d'autres ébauches embryonnaires.

2. Les transplantats prélevés au début de la neurulation d'embryons élevés dans des conditions normales ne peuvent plus construire ni du cerveau ni des organes des sens. Par contre, les greffons du même âge excisés d'embryons cultivés durant toute la gastrulation dans la solution de Holtfreter additionnée d'urée sont eux encore capables de bâtir un cerveau plus ou moins bien développé et les organes des sens correspondants. Il faut en conclure que la plus grande réactivité de l'ectoblaste traité par l'urée au stimulus inducteur est due à l'action de l'urée.

3. L'organisation des structures neurales et sensorielles induites dans l'ectoblaste vieillissant, qu'il soit cultivé *in vitro* avant l'implantation, excisé d'embryons normaux ou bien traité par l'urée, n'est pas sensiblement différente. Cependant, les ébauches oculaires induites dans l'ectoblaste traité par l'urée sont souvent nettement trop volumineuses par rapport au prosencéphale constitué par les mêmes greffons.

4. Dans une publication antérieure j'ai avancé quelques arguments en faveur de l'idée que la diminution dans le temps des compétences de l'ectoblaste vieillissant est le résultat d'une diminution progressive de sa perméabilité aux substances inductrices. Etant donné que l'action perméabilisante de l'urée sur la couche corticale de la cellule en général et de la cellule embryonnaire en particulier est connue de longue date, je puis affirmer que les expériences relatées dans ce travail ont pleinement confirmé l'hypothèse émise dans mon travail précédent.

Cependant, loin de moi l'idée que l'évolution intrinsèque du feuillet externe se ramène entièrement à ce phénomène simple. Au contraire, je crois fermement qu'il s'agit ici d'un processus complexe dont je n'aurais saisi qu'une seule manifestation.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

1951. Fautrez, J. *L'action de l'urée sur le développement embryonnaire de Rana temporaria.* Arch. de Biol. 62, 195.

1952. Gallera, J. *Inductions céphaliques dans l'ectoblaste vieillissant (Triturus alpestris).* Roux' Arch. f. Entw. mech. 146, 21.

1938. Holtfreter, J. *Veränderungen der Reaktionsweise im alternden isolierten Gastrulaektoderm.* Roux's Arch. f. Entw. mech. 138, 163.

1944. —— *Neural differentiation of ectoderm through exposure to saline solution.* J. Exp. Zool. 95, 307.

1945. —— *Neuralization and epidermization of Gastrula ectoderm.* J. Exp. Zool. 98, 161.

1947. —— *Neural induction in explants which have passed through a sublethal cytolysis.* J. Exp. Zool. 106, 197.

1929. Lehmann, F. E. *Die Entwicklung des Anlagenmusters im Ektoderm der Tritongastrula.* Roux' Arch. f. Entw. mech. 117, 312.

1932. Machemer, H. *Experimentelle Untersuchungen über die Induktionsleistungen der oberen Urmundlippe in älteren Urodelenkeimen.* Roux' Arch. f. Entw. mech. 126, 391.

1952. Nieuwkoop, P. D. *Activation and organization of the central nervous system in Amphibians.* J. Exp. Zool. 120, 1.

1951. Schenk, R. *Über Defektoperationen an der dorsalen Urmundlippe junger Gastrulae von Triton alpestris.* Rev. Suisse de Zool. 58, 529.

1950. Yamada, T. *Regional differentiation of the isolated ectoderm of the Triturus gastrula induced through a protein extract.* Embryologia. 1, 1.